

## 吉非替尼脂质体对 S180 荷瘤小鼠生存时间及生命质量的影响

何琳, 马海英

中国医科大学附属第四医院 药学部, 辽宁 沈阳 110032

**摘要:** 目的 考察吉非替尼(GFB)脂质体对 S180 荷瘤小鼠生存时间及生命质量的影响。方法 30 只小鼠制备 S180 荷瘤模型, 随机分为 5 组: 模型组, GFB 低、高剂量溶液(GFB-S-20、GFB-S-40)组, GFB 低、高剂量脂质体(GFB-L-20、GFB-L-40)组, 低、高剂量为 20、40 mg/kg。观察荷瘤小鼠的生存时间、体质量和肿瘤体积的增长情况, 并以自主活动次数为指标, 评价小鼠的生命质量。结果 与模型组比较, GFB 组的生存时间明显延长( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), GFB-L-40 组生存时间显著长于 GFB-S-40 组( $P < 0.05$ ); 模型组小鼠体质量增长最快; 肿瘤生长速度大小顺序为: 模型组 > GFB-S-20 组 > GFB-S-40 组 > GFB-L-20 组 > GFB-L-40 组; GFB 显著改善荷瘤小鼠自主活动次数下降, 相同剂量的溶液和脂质体组之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。结论 GFB 脂质体明显延长了 S180 荷瘤小鼠的生存时间, 提高了生命质量, 效果优于溶液组。

**关键词:** 吉非替尼; 脂质体; S180 荷瘤小鼠; 生存时间; 生命质量

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)03-0403-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.03.014

## Effect of gefitinib liposomes on survival time and quality of life of mice bearing S180 tumor

HE Lin, MA Hai-ying

Department of Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of gefitinib (GFB) liposomes on survival and quality of life of mice bearing S180 tumor. **Methods** The animal model bearing S180 tumor was established in 30 mice. The mice were randomly divided into five groups: model group, low-, high-dose GFB (GFB-S-20, GFB-S-40) groups, and low-, high-dose GFB liposomes (GFB-L-20, GFB-L-40) groups, and the administration of GFB solutions and GFB liposomes were 20 and 40 mg/kg. The growth and survival of mice bearing S180 tumor were observed for statistical analysis. The number of autonomic activity was used as indicator to evaluate the quality of life of S180 tumor-bearing mice. **Results** Compared with model group, the survival time of the mice in GFB group was significantly longer ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), the survival time of GFB-L-40 group was significantly longer than that of GFB-S-40 group ( $P < 0.05$ ), and body weight growth of model group was the fastest; The order of tumor growth speed was as follows: model group > GFB-S-20 group > GFB-S-40 group > GFB-L-20 group > GFB-L-40 group; GFB significantly improved the number decreasing of autonomic activities of tumor bearing mice, and there was significant difference between the same dose of solution and liposome group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** GFB liposomes could prolong the survival time and improve the quality of life obviously in S180 bearing mice, which is better than GFB solution.

**Key words:** gefitinib; liposomes; mice bearing S180 tumor; survival time; quality of life

吉非替尼(gefitinib, GFB)为阿斯利康公司研发的全世界第 1 个用于治疗晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)<sup>[1]</sup>。于 2002 年在日本首次上市, 2003 年 5 月初通过美

国食品与药品管理局(FDA)审批上市, 作为二线或三线药物用于治疗晚期或其他治疗方案无效的 NSCLC 患者。2005 年 2 月 25 日, GFB 经中国国家食品药品监督管理局(State Food and Drug Administration, SFDA)批准正式上市, 用于治疗既往接受过化学治疗或不适于化疗的局部晚期或转

收稿日期: 2016-02-27

作者简介: 何琳(1987—), 女(满族), 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 研究方向为靶向制剂。E-mail: helin19870101@163.com

移性 NSCLC<sup>[2]</sup>。同时, GFB 对晚期头颈部癌、晚期结直肠癌、晚期前列腺癌和晚期乳腺癌也有很好的疗效<sup>[3]</sup>。基于 GFB 有别于其他细胞毒抗肿瘤药物的作用机制, 本研究从生存分析的角度展开长期实验, 采用硫酸铵梯度法将 GFB 制成脂质体<sup>[4]</sup>, 考察不同剂量脂质体对 S180 荷瘤小鼠生存时间<sup>[5]</sup>的影响, 并以自主活动次数为指标, 评价荷瘤小鼠的生命质量<sup>[6]</sup>, 为 GFB 脂质体抗肿瘤临床研究提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物和细胞

昆明种小鼠, 雄性, 体质量 18~22 g, 实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2010-0001, 购自沈阳药科大学实验动物中心。

小鼠 S180 细胞株, 由中国医科大学提供。

### 1.2 药物及主要试剂

吉非替尼原料药 (浙江武义家园医药原料有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$ ); 氢化大豆磷脂 (HSPC, 德国 Lucas meyer cosmetics 公司); 胆固醇 (CH, 南京新百药业有限公司); 聚乙二醇单甲醚 2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (mPEG2000-DSPE, 美国 Genzyme 公司); 硫酸铵 (分析纯, 沈阳试剂厂); 无水乙醇 (药用级, 安徽安特生物化学有限公司); 717 型阴离子、732 型阳离子交换树脂 (国药集团化学试剂有限公司); 其余试剂 (分析纯, 市售)。

### 1.3 主要仪器

756MC 型紫外可见分光光度计 (上海第三分析仪器厂); BS124s 电子分析天平 (德国赛多利斯公司); Anke TDL80-2B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); JY92-2D 超声波细胞粉碎机 (宁波新知科器研究所)。

## 2 方法

### 2.1 脂质体的制备<sup>[7]</sup>及包封率的测定

将 HSPC、CH、mPEG2000-DSPE 按 3:1:1 质量比混合 (HSPC 质量为 200 mg), 加入 0.3 mL 无水乙醇, 于 65 °C 水浴中加热溶解, 加入预热至相同温度的硫酸铵溶液 (150 mmol/L) 4 mL, 65 °C 水浴搅拌 20 min, 得空白脂质体初品。探头超声 (200 W, 2 min; 400 W, 6 min) 后, 依次通过 0.80、0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 得空白脂质体。

取空白脂质体 200  $\mu\text{L}$ , 置于套有玻璃套管的阴阳混合树脂柱顶端, 10 min 后, 2 000 r/min 离心 4 min; 加 200  $\mu\text{L}$  重蒸水于树脂柱顶端, 2 000 r/min 离心 4 min; 继续加入 100  $\mu\text{L}$  重蒸水, 2 000 r/min

离心 4 min, 用玻璃套管收集 3 次离心后的脂质体混合液, 即具有跨膜离子梯度的空白脂质体。

取梯度脂质体, 以药脂比 1:8 加入 4 g/L GFB 溶液, 于 50 °C 下孵育 10 min, 冰水浴终止载药, 即得载药量为 2.5 g/L 的 GFB 脂质体。采用阳离子交换树脂分离-紫外分光光度法<sup>[8]</sup>测定 GFB 脂质体的包封率为  $(95.80 \pm 0.38)\%$ 。

### 2.2 S180 瘤株的接种

液氮中取出保种的 S180 细胞冻存管, 迅速置于 37 °C 温水中复苏。将复苏的 S180 细胞悬液接种于小鼠腹腔内 (0.2 mL/只), 7 d 后, 无菌条件下抽取乳白色粘稠腹水, 在倒置显微镜下计数, 肿瘤细胞活度 $>95\%$ 。加生理盐水稀释成细胞混悬液, 调整稀释倍数, 使其瘤细胞数为  $1.8 \times 10^7/\text{mL}$ 。将混悬液接种于正常小鼠右前腋下的皮下组织, 每只小鼠接种 0.1 mL, 共接种 30 只。

### 2.3 动物分组、给药及指标观察

将 30 只接种 S180 肿瘤的小鼠随机分为 5 组: 模型组, GFB 低、高剂量溶液 (GFB-S-20、GFB-S-40) 组, GFB 低、高剂量脂质体 (GFB-L-20、GFB-L-40) 组, 每组 6 只。低、高剂量为 20、40 mg/kg, 分别于肿瘤接种后第 3 天尾 iv 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 10 d。其中脂质体组给药为“2.1”项下 GFB 脂质体, 溶液组给药为与之载药量相当的 2.5 g/L GFB 溶液。

给药后动物正常饲养, 每隔 1 天称量小鼠体质量, 用游标卡尺测量肿瘤长径 (a) 和短径 (b), 按公式  $V = (a \times b^2) \times 1/2$  计算肿瘤体积, 并观察小鼠的生长状态。

### 2.4 指标评价

计算小鼠的平均生存时间、中位生存时间、生命延长率、体质量增长率和相对肿瘤体积增长率。

平均生存时间、中位生存时间由 Log rank 检验结果直接给出。

生命延长率 = (给药组生存天数 - 对照组生存天数) / 对照组生存天数

生存时间均从给药第 1 天 (接种第 3 天) 开始计算;

体质量增长率 =  $(W_n - W_i) / W_i$

$W_n$ : 给药第 n 天小鼠平均体质量;  $W_i$ : 给药第 1 天小鼠平均体质量;

相对肿瘤体积增长率 =  $(V_n - V_i) / V_i$

$V_n$ : 给药第 n 天小鼠平均相对肿瘤体积;  $V_i$ : 给药第 1 天小鼠平均相对肿瘤体积;

相对肿瘤体积=给药第  $n$  天测量的肿瘤体积/给药第 4 天测量的肿瘤体积

因前期肿瘤尚未完全成型,采用给药第 4 天的肿瘤体积作为基准,计算相对肿瘤体积

## 2.5 自主活动实验

瘤株接种后每隔 1 天测定各组小鼠自主活动次数。将小鼠置于自主活动测定仪中,稳定 10 min 后,启动仪器,记录 5 min 内小鼠隔断光线活动次数。

## 2.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行 Log rank 检验对各组小鼠的平均生存时间、中位生存时间进行统计学分析,另外,对自主活动次数进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 S180 荷瘤小鼠的生存时间及生命延长率

模型组最先出现死亡个体,最早全部死亡,而 GFB-L-40 组小鼠的生存时间最长,结果见图 1。与模型组比较,GFB-S 组和 GFB-L 组的平均生存时间及中位生存时间都明显延长 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。溶液及脂质体的高剂量组的生存时间大于低剂量组,但差异不显著。与 GFB-S 组比较,GFB-L 具有更好的生命延长作用,其中 GFB-L-40 组生命延长率最高,为 74.03%,生存时间显著长于 GFB-S-40 组 ( $P<0.05$ )。结果见表 1。

### 3.2 S180 荷瘤小鼠的体质量增长率

模型组小鼠的体质量增长较快,但后期数据呈不规则性变化。因为从第 18 天开始,个别组出现小鼠死亡,剩余小鼠体质量平均值大幅度波动,变化规律不明显。因此,取前 18 d 的平均体质量增长率对时间作图,以更合理的描述小鼠体质量随时间的变化。各组小鼠体质量增长趋势相同,其中模型组体质量增长最快。结果见图 2、3。

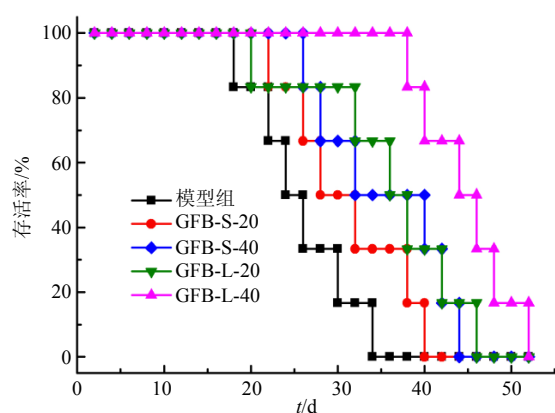


图 1 S180 荷瘤小鼠的生存分析

Fig.1 Survival analysis of S180 tumor bearing mice

表 1 S180 荷瘤小鼠的生存时间及生命延长率 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Survival time and life-prolonging rate of S180-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别       | 平均生存时间/d                  | 中位生存时间/d                  | 生命延长率/% |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------|
| 模型组      | 25.7 $\pm$ 2.3            | 24.0 $\pm$ 2.4            | —       |
| GFB-S-20 | 31.0 $\pm$ 2.9            | 28.0 $\pm$ 3.7            | 20.78   |
| GFB-S-40 | 35.3 $\pm$ 3.1*           | 32.0 $\pm$ 7.3*           | 37.66   |
| GFB-L-20 | 35.7 $\pm$ 3.7*           | 36.0 $\pm$ 3.7*           | 38.96   |
| GFB-L-40 | 44.7 $\pm$ 2.1** $\Delta$ | 44.0 $\pm$ 3.7** $\Delta$ | 74.03   |

与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与 GFB-S-40 组比较:  $\Delta P<0.05$

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs model group;  $\Delta P<0.05$  vs GFB-S-40 group

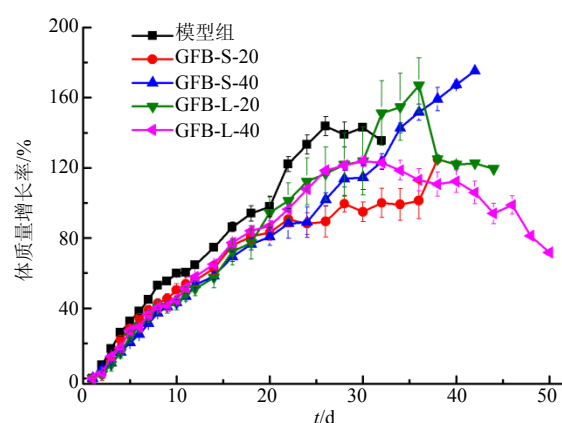


图 2 S180 荷瘤小鼠 52 d 体质量增长率 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Weight increasing for 52 d after injection ( $\bar{x} \pm s$ )

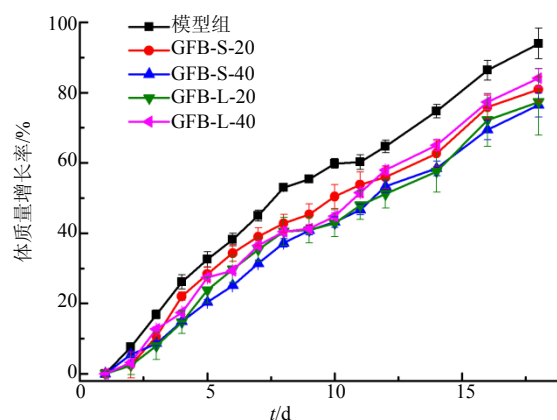


图 3 S180 荷瘤小鼠 18 d 体质量增长率 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Weight increasing rate for 18 d after injection ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.3 S180 荷瘤小鼠的相对肿瘤体积增长率

肿瘤体积的数值只能粗略反映肿瘤大小的变化趋势,不能形象体现变化的程度和速度。以相对肿瘤体积<sup>[9-10]</sup>增长率对时间作图,更直观的反映相对

肿瘤体积随时间变化的程度。随着时间的延长, 各组小鼠的肿瘤体积均有所增长, 肿瘤生长速度大小顺序为: 模型组 > GFB-S-20 组 > GFB-S-40 组 > GFB-L-20 组 > GFB-L-40 组。结果见图 4。参照体质量增长率, 取未见动物死亡的给药后前 18 d 进行作图, 肿瘤生长速度大小顺序为: 模型组 > GFB-S-20 组 > GFB-S-40 组 > GFB-L-20 组 > GFB-L-40 组。结果见图 5。

### 3.5 自主活动实验

肿瘤生长明显影响了小鼠的自主活动, 随着时间推移, 各组小鼠自主活动次数都逐渐减少。其中模型组减少最快, 与其他各组之间均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。相同剂量的溶液和脂质体组之间亦存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。值得注意的是, GFB-L-40 组小鼠自主活动次数下降最慢, 由 ( $211 \pm 14$ ) 次下降至 ( $119 \pm 12$ ) 次 (下降 43.6%), 与

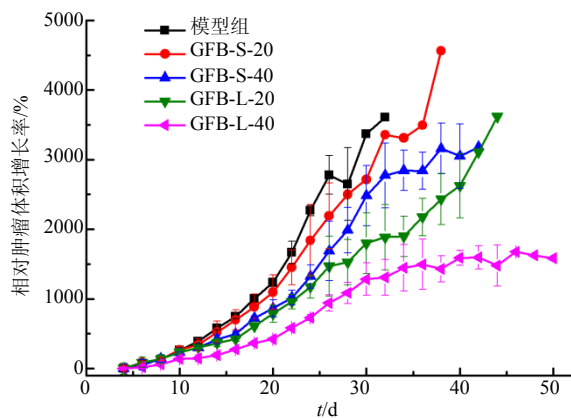


图 4 S180 荷瘤小鼠 52 d 相对肿瘤体积增长率 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 In vivo tumor volume for 52 d after injection ( $\bar{x} \pm s$ )

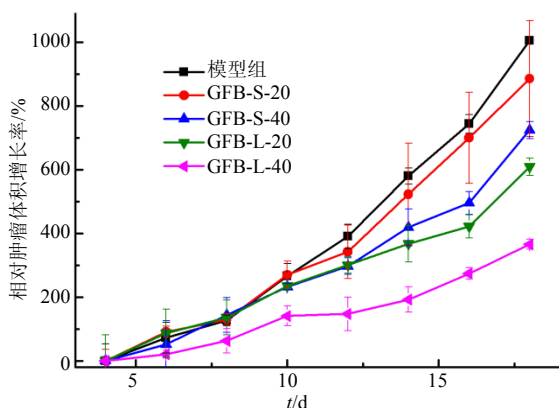


图 5 S180 荷瘤小鼠相对肿瘤体积增长率 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 In vivo tumor volume for 18 d after injection ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

GFB-L-20 组的 ( $206 \pm 17$ ) 次下降至 ( $85 \pm 17$ ) 次 (下降 58.7%) 的数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果见图 6。

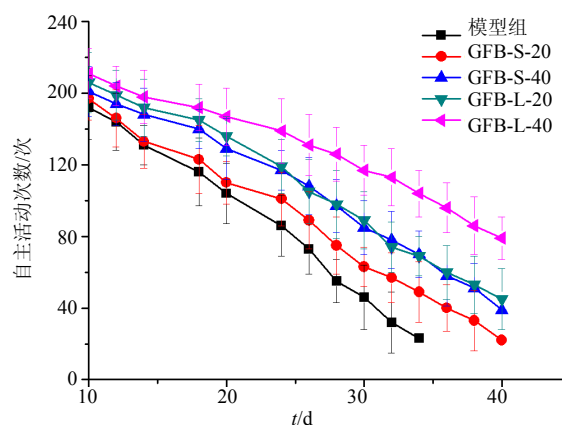


图 6 S180 荷瘤小鼠自主活动次数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 6 Number of autonomic activity after injection ( $\bar{x} \pm s$ )

### 4 讨论

对于急性病, 通常以治愈率、病死率等指标来评价治疗效果, 但对于肿瘤、结核等其他慢性疾病, 其疗效不是短期内所能明确判断的, 因此研究人员一般通过统计一定期限后的生存和死亡情况来判断疗效, 这就是生存分析, 一种以生存时间为变量的统计方法。生存分析可以将事件的结果和出现这一结果所经历的时间结合起来分析, 这一方法不仅可以从事结局的好坏, 而且可以从事件发展的特定时间 (如某患者经治疗后存活的时间) 长短进行分析比较, 因而能够更为全面地反映治疗效果<sup>[11]</sup>。

一般来讲, 对动物模型的肿瘤描述最直观的应该是将动物处死后解剖获得完整肿瘤, 称重并计算抑瘤率<sup>[12]</sup>, 但本实验为了观察荷瘤小鼠生长状态及记录生存时间, 不允许处死动物以获得离体肿瘤样本, 因此通过测量肿瘤大小计算肿瘤体积来间接描述肿瘤的生长情况。考虑到实验设计需要荷瘤小鼠长期生存, 选择在接种瘤株后第 3 天即进行给药, 当时肿瘤刚刚形成, 因此未能根据动物肿瘤大小进行分组。然而瘤株接种和肿瘤细胞存活方面的差异会导致每只小鼠的肿瘤初始体积略有不同, 那么仅采用最终肿瘤体积作为评价指标会存在一定程度的偏差, 因此本研究选用相对肿瘤体积来衡量肿瘤的生长情况, 以弱化初始状态已有的差别。

中位生存时间<sup>[13]</sup>是生存分析中一项重要的考察项目, 又称为半数生存期, 即当累积生存率为 0.5 时所对应的生存时间, 表示有且只有 50% 的个



体可以活过此时间。中位生存时间是临床上评价肿瘤治疗的一个指标,能够全面宏观的描述一种药物制剂的疗效。实验中选用的 GFB 并非传统的细胞毒类抗肿瘤药物,而是作用于细胞内表皮生长因子受体酪氨酸激酶,未必立刻显现出强大的抑瘤率,因此认为采用生存时间来评价 GFB 的抗肿瘤作用更为合适。

本研究设计治疗给药方案,采用硫酸铵梯度法以高包封率将 GFB 主动装载进入脂质体,利用脂质体的增强渗透滞留(EPR)效应<sup>[14]</sup>,增加药物在肿瘤组织的滞留,可以充分发挥 GFB 的分子靶向作用,形成双重靶向,从而提高疗效。由实验结果可知,通过 GFB-L 的治疗,可以将荷瘤小鼠的中位生存时间由 24 天(模型组)延长至 44 天(GFB-L-40 组),生命延长率可达 70%以上。由此可见,GFB-L 可以显著延长荷瘤小鼠的生存时间。另外,在荷瘤小鼠生命质量方面,GFB-L-40 组动物皮毛顺滑,毛色鲜亮,展示出更好的生存状态,自主活动次数与 GFB-L-20 组比较差异显著,某种程度上体现了 GFB 剂量依赖性的特点。而且相同剂量的脂质体组与对照溶液组之间亦差异显著。因此,综合各项实验结果,GFB-L 明显提高了实验动物的生活质量,延长了荷瘤小鼠的生存时间,效果好于 GFB-S 组。

#### 参考文献

- [1] Jorissen R N, Walker F, Pouliot N, *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 284(1):31-53.
- [2] 徐朝江,王卓,姚远兵. 吉非替尼治疗肺癌的研究进展[J]. *医药导报*, 2007, 26(3): 254-257.
- [3] Herbst R S, Maddox A M, Rothenberg M L, *et al.* Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(18): 3815-3825.
- [4] 王宇,何琳,李哲,等. 吉非替尼脂质体的处方工艺优化 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2013, 30(7): 495-500.
- [5] 肖敏,季建美,张国,等. 重楼复方对荷肝癌 H22 小鼠生长及生存时间的影响 [J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(1): 55-58.
- [6] 杨强,翟文君,马艳铃,等. 盐酸表阿霉素脂质体对 S180 荷瘤小鼠生命质量的影响 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28(11): 894-897.
- [7] 何琳,李哲,马艳铃,等. 吉非替尼脂质体的制备及含量测定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(1): 1-4.
- [8] He L, Wang Y, Li Z, *et al.* Determination of entrapment efficiency and transmembrane activation energy of gefitinib liposomes [J]. *Asian J Pharm Sciences*, 2012, 7(6): 393-400.
- [9] 赵利刚,杨清敏,杨光丽,等. 酒石酸长春瑞滨长循环脂质体的包封率测定及药效研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2010, 41(6): 508-512.
- [10] 石玉枝,刘静蕾,霍建民,等. 三氧化二砷对人肺腺癌裸鼠模型抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(1): 52-54.
- [11] 倪宗瓚. 卫生统计学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 209.
- [12] 何琳,马海英. 吉非替尼脂质体对 S180 荷瘤小鼠药效学研究 [J]. *中南药学*, 2015, 13(11): 1159-1162.
- [13] 王荣端,张莉,李彦辉,等. 盐酸多柔比星脂质体注射液药效学研究 [J]. *河北医药*, 2009, 31(21): 2866-2868.
- [14] Maeda H, Wua J, Sawaa T, *et al.* Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review [J]. *J Control Release*, 2000, 65(1-2): 271-28.